



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 664**

51 Int. Cl.:
A23L 1/0522 (2006.01)
A61K 36/064 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00902498 .5**
86 Fecha de presentación : **14.01.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1150577**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2001**

54 Título: **Preparaciones microbianas mejoradas.**

30 Prioridad: **14.01.1999 AU PP8168/99**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es:
Food Technology Innovations Pty. Limited
G13 Biological Sciences Building
University of New South Wales
NSW 2052, AU

72 Inventor/es: **Conway, Patricial, Lynne;**
Brown, Ian, Lewis;
Wang, Xin y
Lucas, Rachel, Jane

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 273 664 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparaciones microbianas mejoradas.

5 **Ámbito técnico**

La presente invención se refiere en general a un procedimiento para preparar una preparación microbiana que contiene microbios que tienen incrementados porcentajes de supervivencia/recuperación en uso. Las preparaciones microbianas que pueden ser obtenidas mediante el procedimiento son particularmente adecuadas para su inclusión en preparaciones prebióticas y probióticas y en productos entre los que se incluyen los productos alimentarios, los productos de alimentación animal, los productos nutracéuticos y los productos farmacéuticos que contienen microorganismos probióticos y los productos fermentados por microorganismos añadidos a los mismos.

15 **Antecedentes de la técnica**

Los productos probióticos realizados por ejemplo en forma de soluciones, polvos, tabletas y cápsulas son administrados oralmente para mejorar la salud. Análogamente, los comestibles son consumidos no tan sólo para el sustento, sino también para obtener adicionales beneficios para la salud tal como mediante la adición de microorganismos probióticos. Los piensos para animales están también siendo preparados con microorganismos probióticos añadidos a los mismos a fin de contribuir al desarrollo y al rendimiento de los animales. Las recientes tendencias al consumo de composiciones probióticas para obtener beneficios para la salud han conducido al uso de microorganismos probióticos en las de una variedad de preparaciones, así como a la inclusión de los mismos en los de una extensa gama de productos alimentarios y de alimentación animal elaborados entre los que se incluyen los productos lácteos elaborados. Los microorganismos son también añadidos como cultivos de arranque a fin de producir una serie de comestibles fermentados, como p. ej. productos lácteos, cárnicos y vegetales.

En el sentido que se le da en esta descripción, un probiótico o microorganismo probiótico es un suplemento microbiano vivo para el pienso que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal. Ésta es la definición que da R. Fuller (AFRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, R.U.) en el Journal of Applied Bacteriology, 1989, 66, pp. 365-378 "Probiotics in Man and Animals - A Review", y la misma se ha hecho posteriormente extensiva a los suplementos y a los comestibles para los humanos. Un probiótico o microorganismo probiótico también incluye a un suplemento microbiano o a una preparación farmacéutica microbiana que puede ser administrado(a) a la cavidad nasal o al tracto vaginal y afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano en el respectivo sitio de administración.

La constitución y la cantidad de la microflora intestinal pueden verse influenciadas por estados de estrés inducido por enfermedad, por el estilo de vida, por los viajes y por otros factores. Si los microorganismos que afectan positivamente a la salud y al bienestar del individuo pueden ser estimulados a poblar el intestino grueso, esto debería mejorar el bienestar fisiológico del huésped.

La introducción de microorganismos beneficiosos o probióticos es normalmente llevada a cabo mediante la ingestión de los microorganismos en comestibles, bebidas, productos lácteos fermentados tales como yogures, cápsulas, dulces y otras formas de tal manera que el organismo llega en estado viable al intestino grueso o a otro sitio de interés en el huésped.

Un problema que se tiene con la inclusión de microorganismos probióticos en productos alimentarios elaborados es el de que los microorganismos a menudo no pueden sobrevivir en el producto alimentario por espacio de cualquier periodo de tiempo. Durante la producción y el almacenamiento de los productos alimentarios, a menudo se produce una considerable disminución de los números de microorganismos viables. Por ejemplo, la habitual duración de conservación de los productos lácteos se calcula sobre la base del periodo de tiempo que puede transcurrir antes de que se estropee el producto. Cuando se añaden microorganismos probióticos a estos productos, la duración de conservación que se indica para el producto puede no ser aplicable con respecto al suministro del deseado número de microorganismos al intestino para obtener el efecto beneficioso requerido.

Brown *et al.* han descrito que si ratones ingieren microorganismos beneficiosos junto con almidón de maíz rico en amilosa (un prebiótico), pueden encontrarse en sus heces mayores números de organismos beneficiosos; en "High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria" Food Australia, 50(12) 1998 pp. 603-610. Sus experimentos indican que los gránulos de almidón actúan como un vehículo para proteger a los microorganismos frente a los estados hostiles/estreses que se dan en el tracto gastrointestinal.

Otros usos de microbios incluyen el biocontrol y la biorremediación. Preparaciones microbianas que incluyesen microbios que fuesen adecuados para estos usos y tuviesen un incrementado potencial de producción/desarrollo o unos incrementados porcentajes de supervivencia/recuperación constituirían una ventaja. Por ejemplo, ciertas cepas de *Bifidobacterium* y *L. acidophilus* son activas contra *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, lo cual significa que las bacterias tienen aplicaciones como agentes de biocontrol. Otros microbios también tienen aplicaciones de biocontrol, como por ejemplo varias especies de hongos y *Bacillus*. Además, se sabe de las Pseudomonadas que son eficaces para la biorre-

mediación, y la presente invención es aplicable para promover su supervivencia. Otro microbio de biorremediación que es usado comúnmente es el del género *Alcaligenes*.

Los presentes inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que la inclusión de almidón resistente que esté en forma de o haya sido sacado de almidones que contengan fibra dietaria en el medio de cultivo para los microorganismos puede incrementar el desarrollo y la producción de los microorganismos, así como incrementar la supervivencia de los microorganismos en preparaciones microbianas o cultivos de arranque y en productos alimentarios y de alimentación animal durante la producción y durante la duración de conservación de estos productos, y mejorar el porcentaje de supervivencia de los microbios durante el tránsito por el tracto digestivo.

La fibra dietaria está definida según la medición de la AOAC (Asociación (Internacional) de la Química Analítica Oficial) para la fibra dietaria Total en los comestibles: método enzimo-gravimétrico (Método 985.29). Assoc. Off. Anal. Chemists, Official Methods of Analysis, 16ª Ed., Arlington VA, EE.UU., 1995. La adicional adición de almidón resistente a las preparaciones microbianas tras el cultivo del microbio también acrecienta adicionalmente la robustez de los microbios, conduciendo por consiguiente a una acrecentada supervivencia de los microorganismos. El descubrimiento es también aplicable a las preparaciones de biocontrol y biorremediación, así como a los comestibles fermentados mediante la adición de microorganismos y a los cultivos de arranque, puesto que pueden también producirse cultivos de arranque más robustos mediante el cultivo sobre medio con almidón resistente y/o mediante la adición de almidón resistente a los productos subsiguientes que se han descrito anteriormente.

Descripción de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se aporta un procedimiento para preparar una preparación microbiana que tiene un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en un producto, comprendiendo el procedimiento los pasos de producir o cultivar microbios en medios basados en almidón resistente o que lo contengan, y recolectar los microbios cultivados, teniendo los microbios recolectados un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación al ser posteriormente incorporados a un producto en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en un medio carente de almidón resistente.

Preferiblemente, el producto es un producto alimentario, un producto de alimentación animal, un producto nutracéutico, un producto farmacéutico, un producto de biocontrol o un producto de biorremediación.

Una forma de almidón resistente que es particularmente adecuada para la presente invención es la del almidón que contiene almidón resistente, y particularmente la de los almidones de maíz ricos en amilosa o los materiales derivados de almidones de maíz ricos en amilosa.

Se ha descubierto que el cultivo en medios basados en almidón resistente o que lo contengan parece acrecentar la capacidad de los microbios para fijarse al almidón resistente adicional añadido al producto, acrecentando por consiguiente el potencial de desarrollo/producción, o dando lugar a un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación de los microbios.

Los microbios que se usan en el procedimiento de la presente invención o los microbios que están presentes en la preparación microbiana mejorada que puede ser obtenida mediante un procedimiento de la presente invención pueden ser particularmente resistentes a la aireación, al cizallamiento, al secado por congelación, a la congelación, al secado incluyendo la alta, la mediana y la baja hidroactividad, a las temperaturas elevadas, a las bajas temperaturas, a la presión y a las fluctuaciones de presión, al bajo pH, al alto pH, a los ácidos biliares, a la humedad, a la alta o baja osmolaridad, a las condiciones altamente salinas o a combinaciones de dichas condiciones.

Los microbios que se usan en el procedimiento de la presente invención o la preparación microbiana que puede ser obtenida mediante un procedimiento según la presente invención son particularmente adecuados para ser usados en probióticos, cultivos de arranque y agentes de biocontrol o biorremediación.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se aporta una preparación microbiana que contiene microbios que tienen un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en el producto en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en un medio carente de almidón resistente y que puede ser preparada mediante el procedimiento según el primer aspecto de la presente invención.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se aporta un producto que contiene microbios que tienen un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en un medio que carezca de almidón resistente, incluyendo el producto una preparación microbiana según el segundo aspecto de la presente invención.

Preferiblemente, el producto es un producto alimentario, un producto de alimentación animal, un producto nutracéutico, un producto farmacéutico o un producto de biocontrol o biorremediación.

Según un cuarto aspecto de la presente invención, se aporta el uso de almidón resistente en medios de cultivo microbiano para producir microbios que al ser posteriormente usados en un producto tras haber sido recolectados

a partir del medio tienen un incrementado porcentaje de supervivencia en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en medios carentes de almidón resistente.

Una forma de almidón resistente que es particularmente adecuada para la presente invención es la del almidón que contiene almidón resistente. Preferiblemente, los almidones tienen un contenido de amilosa de al menos un 40% (en peso). En una forma preferida, el almidón es de maíz que tiene un contenido de amilosa de al menos un 70% (en peso), al menos un 80% (en peso) o al menos un 90% (en peso). El almidón puede también ser tratado o modificado químicamente, físicamente o enzimáticamente. La modificación química puede ser por oxidación, reticulación, eterificación, esterificación, acidificación, dextrinización o mezclas de estos procesos.

Los almidones pueden también ser tratados para incrementar el contenido de almidón resistente utilizando para ello una serie de medios físicos o químicos. Unos medios preferidos son los que consisten en calentar el almidón en presencia de humedad (tratamiento con calor y humedad), lo cual puede lograrse mediante una serie de procedimientos entre los cuales se incluye el de efectuar un calentamiento bajo presión negativa, atmosférica o positiva y en condiciones de elevada humedad, o las técnicas de ciclación pasando por distintas temperaturas y presiones. El calentamiento puede ser efectuado a temperaturas del orden de 100 a 180°C, y preferiblemente de poco más o menos 120 a 150°C, y los niveles de humedad pueden ser de un 10 a un 80%, y preferiblemente de un 20 a un 60%. Puede también usarse para incrementar el contenido de almidón resistente de los almidones el repetido autoclaveado y el enfriamiento rápido. Se comprenderá que estos procedimientos y condiciones pueden ser modificados para alcanzar el deseado incremento del nivel de almidón resistente en el almidón que se trate.

El tratamiento puede también ser el consistente en la técnica de extracción con disolvente para retirar del almidón las grasas y/o los minerales.

Hay una variedad de microorganismos probióticos que son adecuados para ser usados en esta invención, estando incluidos entre los mismos levaduras tales como *Saccharomyces* y bacterias tales como las de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Peptostreptococcus* y *Lactobacillus*. La invención no queda sin embargo limitada a estos microorganismos específicos.

Aunque sin quedar limitados a las mismas, los cultivos de arranque preferiblemente incluyen bacterias del ácido láctico incluyendo los géneros *lactobacillus*, *lactococcus* y *streptococcus*, *leuconostoc* y levaduras.

Preferiblemente, los microorganismos que son adecuados para ser usados en productos de biocontrol o biorremediación incluyen *bifidobacterias*, *acidophilus*, hongos, especies de *Bacillus*, *pseudomonadas* y Alcaligenes. Se entenderá, sin embargo, que otras especies de microorganismos serían también candidatos adecuados para el uso según la presente invención.

Tales sistemas pueden también incluir microorganismos de distintas cepas o especies, incluyendo a no utilizadores de almidón, para interactuar y demostrar un mejorado desarrollo y/o actividad en el intestino grueso, el tracto nasal o el tracto vaginal.

En una realización preferida de los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto de la presente invención, las preparaciones microbianas son cultivos de arranque o preparaciones probióticas que pueden ser líquidos, congelados o secados. Las preparaciones pueden también incluir productos alimentarios y de alimentación animal que contengan otros aditivos microbianos. Estos productos incluyen productos de base fluida o de base sólida. Los productos alimentarios de base fluida incluyen productos lácteos en los que el ingrediente comestible es uno o varios ingredientes lácteos entre los que se incluyen la leche entera, los sólidos de la leche, la grasa de leche, la crema, la leche secada sin grasa y cualquier otro componente o derivado de la leche que pueda ser usado en productos lácteos, fluidos basados en agua, extractos de cereales y plantas tales como aditivos y bebidas basados en soja. Los productos alimentarios de base sólida incluyen las barras de tentempié, los cereales para desayuno, el pan, los dulces, los productos alimentarios extrusionados, las barras de muesli, los bollos, las galletas, las pellas de pienso, los productos alimentarios recubiertos, las tabletas, los aditivos alimentarios, los suplementos para la salud y las preparaciones farmacéuticas.

Los productos alimentarios según el tercer aspecto de la presente invención incluyen todo producto alimentario que sea adecuado para contener y suministrar microorganismos probióticos. Aunque sin quedar limitados a los mismos, los ejemplos incluyen los comestibles, las bebidas frutales, los cubitos de agua, los dulces, los recubrimientos o coberturas, los yogures, las bebidas de yogur, las bebidas no fermentadas, las bebidas lácteas saborizadas, las bebidas lácteas modificadas, los helados y los postres lácteos.

Los métodos estándar que se emplean en la técnica pueden ser usados para preparar los productos alimentarios, de alimentación animal, nutracéuticos o farmacéuticos según el cuarto aspecto de la presente invención. El almidón resistente puede ser añadido por separado, en combinación con uno o varios de los ingredientes que formen parte del producto alimentario. Al ser añadido por separado, el almidón resistente puede interactuar positivamente y/o sinérgicamente con otros ingredientes de los productos alimentarios, de alimentación animal, nutracéuticos o farmacéuticos.

ES 2 273 664 T3

El incremento del porcentaje de supervivencia de los microbios en el producto se refiere a un incremento sobre el previsto porcentaje de supervivencia del mismo microbio en un producto similar que no contiene los microbios cultivados en almidón resistente.

5 En una forma preferida, el almidón resistente es de la gama de productos de almidón resistente Hi-maize^{MF} y Culture Pro^{MF} (MF = Marca de Fábrica). El almidón resistente puede ser usado en medios de cultivo a una concentración de aproximadamente un 0,01 a un 10% (en peso) y en subsiguientes adiciones durante la preparación de las preparaciones microbianas y en productos alimentarios, de alimentación animal, nutracéuticos o farmacéuticos líquidos. Preferiblemente, el almidón resistente es usado a una concentración de un 0,1 a un 5% (en peso), y más preferiblemente a una
10 concentración de poco más o menos un 1% (en peso). El almidón que contiene almidón resistente y/o fibra dietaria puede ser usado en productos alimentarios, de alimentación animal, nutracéuticos o farmacéuticos secos y en preparaciones microbianas secas a una concentración de aproximadamente un 0,1 a un 90% (en peso) de la preparación o del producto total. Preferiblemente, el almidón es usado a una concentración de aproximadamente un 1 a un 10% (en peso).

15 El almidón resistente ha resultado ser particularmente adecuado en comestibles basados en fluido a una concentración de un 0,1 a un 5% en peso/volumen, en comestibles de base sólida a una concentración de un 0,1 a un 15% (en peso), y en productos de alimentación animal, nutracéuticos o farmacéuticos a una concentración de un 0,1 a un 95% (en peso).

20 Una ventaja adicional del uso de almidón resistente es la de que también puede añadirse almidón resistente adicional en cualquier etapa durante la elaboración del producto alimentario, de alimentación animal, nutracéutico o farmacéutico. Las propiedades del almidón resistente no se ven afectadas negativamente por los procesos que intervienen en la producción de los productos elaborados. Una clara ventaja es la de que no hay necesidad de añadir el almidón resistente en forma estéril al final del proceso. El producto puede ser sometido a pasteurización o a un
25 tratamiento similar sin la preocupación de afectar negativamente las propiedades de los almidones.

En el sentido en el que se la utiliza en esta descripción, la expresión “almidón resistente” incluye las formas definidas como RS1, RS2, RS3 y RS4 según se define en Brown, McNaught and Moloney (1995) Food Australia 47: 272-275. Pueden usarse en la presente invención almidones resistentes modificados o no modificados o mezclas de los
30 mismos.

En los documentos WO 94/03049 y WO 94/14342 se describen almidones ricos en amilosa que son almidones resistentes e incluyen almidón de maíz que tiene un contenido de amilosa de un 50% (en peso) o más, y en particular
35 de un 80% (en peso) o más, almidón de arroz que tiene un contenido de amilosa de un 27% (en peso) o más, o un almidón de trigo que tiene un 35% (en peso) o más. Están además incluidas determinadas gamas de tamaños granulares de almidones que tienen un contenido de amilosa de un 50% o más y un acrecentado contenido de almidón resistente, incluyendo estos almidones los de maíz, cebada y legumbres. Sin embargo, esta invención no queda limitada a estas formas de almidón resistente. Por ejemplo, otras formas de almidón resistente se derivan de fuentes tales como los
40 plátanos y tubérculos tales como patatas y formas modificadas de los mismos.

Las modificaciones químicas tales como las que se efectúan por oxidación, reticulación, eterificación, esterificación, acidificación, dextrinización y procesos similares son perfectamente conocidas en este ramo de la técnica como adecuados tratamientos químicos. Análogamente, otras modificaciones pueden ser inducidas físicamente, enzimáticamente o bien por otros medios que son perfectamente conocidos para los expertos en la materia.
45

Puede también ser útil modificar el grado de susceptibilidad enzimática del almidón resistente a base de alterar la conformación o la estructura del almidón. Los ejemplos incluyen la dilución con ácidos o enzimas y la reticulación usando reactivos difuncionales, el tratamiento con calor y humedad y la recristalización térmica. La modificación
50 del almidón puede ser también efectuada mediante una manipulación de la naturaleza cristalina del almidón. Tales métodos de modificación son conocidos en la técnica, y los almidones producidos por estos métodos serían adecuados para la presente invención.

Preferiblemente, los almidones resistentes se sacan o se obtienen del maíz. Se entenderá, sin embargo, que en la presente invención podrían usarse otras fuentes de almidón resistente. Los ejemplos incluyen cereales tales como
55 sorgo, trigo, cebada, avena y arroz, tubérculos tales como patatas y tapioca, legumbres tales como guisantes, y otros incluyendo almidones sacados de especies vegetales modificadas genéticamente.

En el sentido en el que se les utiliza en la presente, los vocablos “Hi-maize^{MF}” y “Culture Pro^{MF}” se refieren a productos que son obtenidos de almidón rico en amilosa que contiene más de un 70% de amilosa y son suministrados por la Starch Australasia Limited. Están descritos en el documento AU 660560 almidones ricos en amilosa que contienen almidón resistente adecuado para la presente invención.
60

En toda esta descripción y a no ser que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que el vocablo “comprenden” o variaciones del mismo tales “comprende” o “comprendiendo” implican la inclusión del elemento, entero o paso que se indique o del correspondiente grupo de elementos, enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o paso o grupo de elementos, enteros o pasos.
65

ES 2 273 664 T3

A fin de que pueda entenderse más claramente la presente invención, se describen a continuación formas preferidas de la misma haciendo referencia a los siguientes ejemplos y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra el cultivo de *Bifidobacterium* de la cepa D con y sin almidón.
- La Figura 2 muestra el cultivo de *Bifidobacterium* de la cepa E con y sin almidón.
- 10 La Figura 3 muestra el cultivo de *Bifidobacterium* de la cepa C con y sin almidón.
- La Figura 4 muestra la supervivencia/recuperación de microbios cultivados en almidón en una bebida de base probiótica evaluada para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- 15 La Figura 5 muestra la supervivencia/recuperación de microbios cultivados en almidón en una bebida láctea fermentada tipo yogur evaluada para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- 20 La Figura 6 muestra la supervivencia/recuperación de microbios cultivados en almidón en zumo de naranja evaluado para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- La Figura 7 muestra la supervivencia/recuperación de microbios cultivados en almidón en bebida de base probiótica con la inclusión de almidón resistente adicional evaluada para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- 25 La Figura 8 muestra la supervivencia/recuperación de microbios cultivados en almidón en producto lácteo fermentado tipo yogur con inclusión de almidón resistente adicional evaluado para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- 30 La Figura 9 muestra la supervivencia/recuperación de microbios cultivados en almidón en zumo de naranja con la inclusión de almidón resistente adicional evaluado para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- 35 La Figura 10 muestra la supervivencia/recuperación de las cepas expuestas a un ciclo de congelación-descongelación tras el cultivo en presencia de almidón resistente. La *Bifidobacterium* de la cepa C había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%).
- La Figura 11 muestra la supervivencia/recuperación de las cepas expuestas a un ciclo de congelación-descongelación tras el cultivo en presencia de almidón resistente. La *Bifidobacterium* de la cepa C había sido cultivada en presencia de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) con adición de adicional Almidón 1.
- 45 La Figura 12 muestra la supervivencia/recuperación de las cepas expuestas a un ciclo de congelación-descongelación tras el cultivo en presencia de almidón resistente. La *Bifidobacterium* de la cepa C había sido cultivada en presencia de Almidón 2 (0,5%) con adición de adicional Almidón 1.
- 50 La Figura 13 muestra la supervivencia de *Bifidobacterium* de la cepa C cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%) y puesta luego en varios tipos de yogures sin almidón añadido.
- 55 La Figura 14 muestra la supervivencia de *Bifidobacterium* de la cepa C cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%) y puesta en varios tipos de yogures con almidón añadido.

Modos de ejecutar la invención

- 60 Los presentes inventores han descubierto que la inclusión de almidón resistente en medios de cultivo microbiano y opcionalmente en subsiguientes etapas de la producción de preparaciones microbianas que contienen los microbios cultivados en presencia de almidón resistente redundaba en un sorprendente e inesperado incremento del crecimiento, de la recuperación y/o de la supervivencia de los microbios durante la producción y el almacenamiento de las preparaciones y los productos.
- 65

ES 2 273 664 T3

Ejemplo 1

Bacterias del género *Bifidobacterium* y de la cepa Lafti^{MF} 13B fueron cultivadas anaerómicamente en un medio de agar basal (BM) suplementado con un 1% (en peso) de glucosa o de almidón resistente (Culture Pro^{MF}). Tras el cultivo, las células fueron recolectadas de las placas usando salina tamponada con fosfato (PBS), y se procedió a mezclar partes alícuotas con PBS o bien con PBS que contenía los gránulos de almidón (10% en peso). Fueron secadas por congelación partes alícuotas de las mezclas. La susceptibilidad de las células Lafti^{MF} 13B al bajo pH fue evaluada añadiendo las mezclas bacterianas antes del secado por congelación y rehidratadas después del secado por congelación a tampón de glicina a un pH de 3,5. Las células viables fueron contadas determinando las unidades formadoras de colonias usando placas de Triptona-Extracto de Levadura-Pectona (TYP) al ser efectuada la adición a un pH de 3,5 y tras 3 horas. Se presenta en la Tabla 1 la reducción de la viabilidad a lo largo de las 3 horas. Se observó que las células cultivadas en presencia de almidón eran más resistentes, y que la inclusión del almidón acrecentaba adicionalmente la resistencia.

15

TABLA 1

La reducción de la viabilidad de las células de Bifidobacterium a lo largo de las 3 horas

20

	Presencia de almidón tras el cultivo	Reducción de la viabilidad
Células cultivadas con glucosa	-	26 x 10 ²
células cultivadas con glucosa	+	15 x 10 ²
Células cultivadas con almidón	-	26
Células cultivadas con almidón	+	5

25

Ejemplo 2

30

Bacterias del género *Bifidobacterium* y de la cepa Lafti^{MF} 13B fueron precultivadas en caldo Basal (BM) suplementado con un 1% en peso/volumen de glucosa o gránulos de almidón de maíz rico en amilosa (Culture Pro^{MF}). Los cultivos cultivados anaerómicamente fueron inoculados (10 µl) en agar BM o en caldo, conteniendo ambos medios un 1% (en peso/volumen) de glucosa o Culture Pro^{MF}. Las placas fueron inoculadas puntualmente o extendidas, y fueron luego incubadas anaerómicamente por espacio de 48 horas. El cultivo en caldo o las células recolectadas de las placas extendidas fueron cuantificados contando las unidades formadoras de colonias (CFU). El cultivo en placas inoculadas puntualmente fue cuantificado midiendo el tamaño de la colonia, así como el tamaño de la zona despejada en torno a la colonia, que era indicativo de la utilización del almidón por parte de las células de *Bifidobacterium*. Se observó que la cepa Lafti^{MF} 13B crecía más rápidamente en medio con contenido de almidón al ser precultivada usando medio con contenido de almidón, y producía mayores colonias y zonas despejadas en las placas de agar que contenían almidón. Además, era mayor la producción de los medios con contenido de almidón, en comparación con los medios con glucosa, para las células precultivadas tanto en caldo de control (glucosa) como en caldo con almidón.

35

40

Resultados

45

La recuperación de microorganismos viables tras el cultivo en presencia de almidón era más alta y más rápida que la correspondiente a los controles de glucosa.

50

El cultivo en medios con almidón acrecentaba la producción de microorganismos tras la exposición a condiciones de estrés, como es por ejemplo el caso de la exposición a un bajo pH, a los ácidos biliares, a ácidos, al calor, a la humedad, a la presión, al secado por congelación o al secado por pulverización ya sea en solitario o bien en combinación.

55

El precultivo en medio con almidón antes del cultivo en medio con almidón acrecentaba la recuperación/supervivencia tras una exposición a condiciones de estrés como las perfiladas anteriormente, además de acrecentar la producción.

El cultivo en medio con almidón y luego la adición de almidón incrementaban la resistencia a condiciones de estrés como las perfiladas anteriormente.

60

Se ilustra adicionalmente la invención mediante los ejemplos siguientes usando dos almidones que contienen almidón resistente y son los llamados Almidón 1 (con aproximadamente un 20% (en peso) de almidón resistente) y Almidón 2 (con aproximadamente un 60% (en peso) de almidón resistente), siendo dichos almidones almidones granulares de maíz rico en amilosa, así como una serie de cepas de *Bifidobacterium* a las que se llama cepas A, B, C, D, E y F.

65

Ejemplo 3

Se estudió el crecimiento y la producción de *Bifidobacterium* de la cepa D, *Bifidobacterium* de la cepa E y *Bifidobacterium* de la cepa C en presencia de almidón de maíz granular natural. Un precultivo de la cepa fue cultivado en 20 ml de caldo PYG por espacio de 18 horas y fue usado para inocular (partes alícuotas de 0,1 ml) 20 ml de medio de cultivo PY que contenía glucosa (0,5%), Almidón 1 (0,5%), Almidón 2 (0,5%) o una mezcla de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%). Los cultivos fueron incubados en una cámara anaeróbica a 37°C y muestreados a las 0, 4, 7, 12, 24, 31, 48 y 72 horas para supervisar el número de células viables determinado como unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (CFU/ml⁻¹). Los resultados que se presentan en la Figura 1 para *Bifidobacterium* de la cepa D ponen de manifiesto que la inclusión de Almidón 1 (0,25%) junto con un 0,25% de glucosa redundó en un acrecentado crecimiento y una acrecentada producción de la cepa D en comparación con el 0,5% de glucosa en solitario. Para *Bifidobacterium* de la cepa E (Figura 2) el crecimiento fue más rápido en caldo con Almidón 2 en comparación con el control de glucosa. El crecimiento de la cepa E fue también acrecentado en el caldo con Almidón 1 + glucosa en comparación con el control de glucosa. Para *Bifidobacterium* de la cepa C se observó una distinta forma de crecimiento y producción. Como se muestra en la Figura 3, mientras que la velocidad de crecimiento no era marcadamente distinta para los distintos caldos, al ser cultivada en glucosa esta cepa moría bastante rápidamente una vez que había sido obtenida la producción máxima a las 18 horas aproximadamente. La cepa mantenía una más alta producción cuando se incluían Almidón 1 o Almidón 2.

Ejemplo 4

La supervivencia/recuperación de microbios cultivados en presencia de almidón en comestibles fue evaluada para *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%). Las células de *Bifidobacterium* fueron recolectadas tras 40 horas de cultivo anaeróbico y fueron diluidas en el producto alimentario para así obtener aproximadamente 10⁵ CFU por ml de comestible. Los comestibles sometidos a ensayo incluyen zumo de naranja, una bebida de base probiótica y un producto lácteo fermentado tipo yogur. Los productos alimentarios que contenían las células de *Bifidobacterium* de la cepa C fueron almacenados a temperatura ambiente (para condiciones de almacenamiento acelerado) y muestreados a los 0, 1, 2, 5 y 6 días para cuantificar la supervivencia de las células de *Bifidobacterium* de la cepa C. Según los resultados que se presentan en la Figura 4, se produjo una acrecentada supervivencia de la cepa C en la bebida de base probiótica cuando la cepa fue previamente cultivada en presencia de Almidón 1 y 2. Análogamente, en el producto lácteo fermentado tipo yogur se observó una acrecentada supervivencia de la cepa C. Para las células cultivadas en presencia de almidón (Figura 5) y en zumo de naranja para las células cultivadas en presencia de almidón (Figura 6).

Ejemplo 5

La inclusión de almidón resistente adicional a microorganismos cultivados en presencia de almidón resistente redundó en una acrecentada supervivencia cuando los microorganismos fueron añadidos a productos alimentarios. Esto fue investigado usando *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%). Las células de *Bifidobacterium* fueron recolectadas tras 40 horas de cultivo anaeróbico y mezcladas con un 2,5% de Almidón 1 por espacio de 1 hora. Las células más los gránulos de almidón fueron entonces recolectados mediante centrifugación y añadidos al producto alimentario para así obtener aproximadamente 10⁵ CFU por ml de comestible. Los productos sometidos a ensayo incluían zumo de naranja, una bebida de base probiótica y un producto lácteo fermentado tipo yogur. Los productos alimentarios que contenían las células de *Bifidobacterium* de la cepa C con almidón adicional fueron almacenados a temperatura ambiente (para condiciones de almacenamiento acelerado) y muestreados a los 0, 1, 2, 5 y 6 días para cuantificar la supervivencia de las células de *Bifidobacterium* de la cepa C. Como se ilustra en la Figura 7, la inclusión de Almidón 1 adicional prolongó la supervivencia de las bacterias en una bebida de base probiótica independientemente del medio de cultivo que se usase, y, como se ve en la Figura 8, en el producto lácteo fermentado tipo yogur. El almidón adicional también prolongó la supervivencia de la cepa C en zumo de naranja (Figura 9).

Ejemplo 6

Usando *Bifidobacterium* de la cepa C, ratones hembra de 20 g fueron intubados orogástricamente con una suspensión de células recolectadas de placas basadas en glucosa o placas basadas en Almidón 1 o Almidón 2. Las suspensiones bacterianas fueron estandarizadas a una consistente densidad óptica que correspondía a aproximadamente 10⁸ por ml de diluyente. Las células de *Bifidobacterium* en las muestras fecales recién evacuadas fueron contadas usando placas de agar PAM, y la identificación fue confirmada usando la reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras fecales fueron recolectadas a las 4, 10, 24 y 48 horas de la administración de la *Bifidobacterium*. No fueron detectadas células de *Bifidobacterium* en los ratones que habían recibido las dosis de células cultivadas en presencia de glucosa (Tabla 2). En el caso de los ratones que habían recibido las dosis de cepa C cultivada en agar con Almidón 1, a las 4 y a las 10 horas de la administración oral la detección en las heces era de aproximadamente log 7 de CFU por gramo de peso en húmedo. Los números disminuían en las muestras obtenidas a las 24 y 48 horas, pero eran aún detectables. Cuando fueron administradas orogástricamente a ratones dosis de *Bifidobacterium* de la cepa C cultivada en agar con Almidón 2, fue detectada una cantidad de aproximadamente log 8 de CFU por gramo de peso en húmedo de las heces a las 4 y a las 10 horas de la administración, con una disminución para las muestras tomadas a las 24 y 48 horas. Se

ES 2 273 664 T3

sacó la conclusión de que el cultivo en agar basado en almidón resistente redundaba en células de bifidobacterium que eran más resistentes a condiciones *in vivo* que incluirían las de un bajo pH estomacal, los ácidos biliares y las enzimas pancreáticas.

TABLA 2

Recuperación de Bifidobacterium de la cepa C de las heces recién evacuadas de ratones que recibieron orogástricamente dosis de células de Bifidobacterium de la cepa C que habían sido cultivadas en agar con glucosa, agar con Almidón 1 o agar con Almidón 2. Resultados expresados como CFU por gramo de peso en húmedo de las heces

Tiempo tras la dosificación (h)	Agar con glucosa	Agar con Almidón 1 (CFU por g de peso en húmedo)	Agar con Almidón 2
4	ND	5.8 X 10 ⁶	2.5 x 10 ⁸
10	ND	2.5 X 10 ⁷	6.0 x 10 ⁷
24	ND	> 10 ⁶	> 10 ⁶
48	ND	> 10 ⁵	> 10 ⁵

ND - no se detectó ninguna

Ejemplo 7

Se comprobó que los microorganismos cultivados en presencia de almidón resistente eran más resistentes al estrés físico como ilustra el ejemplo siguiente, en el cual cepas de bifidobacterium fueron expuestas a un ciclo de congelación-descongelación tras el cultivo en presencia de almidón resistente. *Bifidobacterium* de la cepa C que había sido cultivada en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%). Las células de bifidobacterium fueron recolectadas tras 40 horas de cultivo anaeróbico, y las muestras fueron divididas en dos. Una parte fue congelada directamente (a -20°C), y la otra parte fue mezclada un 2,5% de Almidón 1 por espacio de 1 hora. Las células más los gránulos de almidón fueron entonces recolectados por centrifugación, y fueron también congelados a -20°C. Las células de bifidobacterium viables fueron cuantificadas tras 0, 1, 2, 3 y 4 ciclos de congelación-descongelación que suponían descongelar las muestras a temperatura ambiente cada día durante 4 días. Como se ilustra en la Figura 10, el cultivo en presencia de almidón resistente antes de la exposición al estrés físico acrecentaba la supervivencia de la bifidobacterium. Además, la adición de más almidón resistente antes de la congelación mejoraba adicionalmente la supervivencia de las células de Bifidobacterium (Figuras 11 y 12).

Ejemplo 8

Las bacterias cultivadas en presencia de almidón resistente y posteriormente secadas por congelación antes del almacenamiento a elevadas temperaturas eran más resistentes a las elevadas temperaturas que las cultivadas en ausencia del almidón. Tres cepas de *Bifidobacterium*, que eran concretamente las cepas A, B y D, fueron cultivadas cada una en fermentadores con control del pH. La biomasa celular fue recolectada y secada por congelación. El polvo secado fue entonces almacenado a 42°C por espacio de 7 días y muestreado diariamente durante 4 días y luego de nuevo el día 7 para cuantificar las bifidobacterias viables. Los resultados están expresados como unidades formadoras de colonias por gramo de polvo secado. Como se ilustra en la Tabla 3, las células que fueron cultivadas en presencia de Almidón 1 sobrevivieron mejor o fueron recuperadas a niveles más altos en comparación con las cultivadas en ausencia del almidón resistente.

TABLA 3

Supervivencia de las cepas A, B y D de Bifidobacterium secadas por congelación en incubación a 42°C

Tiempo (d)	Cepa A		Cepa B		Cepa C	
	Sin almidón	Con almidón	Sin almidón	Con almidón	Sin almidón	Con almidón
0	10.52	10.59	10.58	10.56	10.65	10.58
1	10.30	10.23	10.23	10.40	10.11	10.20
2	9.11	10.11	7.83	10.08	7.76	9.83
3	7.26	10.00	5.00	9.53	5.00	8.53
4	4.60	9.48	4.00	8.08	4.00	5.68
7	0.00	804	0.00	0.00	0.00	1.30

ES 2 273 664 T3

Ejemplo 9

Fue supervisada la supervivencia de *Clostridium butyricum* tras el cultivo en caldo sin almidón añadido. Las células fueron recolectadas y puestas nuevamente en suspensión en tampón a un pH de 3,8 que contenía un 2,5% de Almidón 1, un 2,5% de Almidón 2, un 2,5% de celulosa o un 2,5% de Almidón 3, y las células viables resultantes fueron cuantificadas tras haber transcurrido 3 horas. Los resultados están expresados como porcentaje referido a la cuenta viable inicial. Como puede verse en la Tabla 4, la presencia de Almidón 2 acrecentó la supervivencia. La celulosa no ofreció protección contra la pérdida de viabilidad como se observó que lo hacía el almidón resistente.

TABLA 4

Supervivencia de las bacterias Clostridium butyricum cultivadas en ausencia de almidón resistente y luego combinadas con un 2,5% de Almidón 1, 2 o 3 en suspensión en tampón que está a un pH de 3,8. La pérdida de viabilidad fue supervisada tras 3 horas de exposición al pH de 3,8

Adición de almidón	Porcentaje viable tras 3 horas a un pH de 3,8
Sin almidón	80.5
Almidón 1	71.3
Almidón 2	111.3
Celulosa	ND
Almidón 3	66.0

ND = no detectado porcentaje alguno

Ejemplo 10

Se demostró que hay sinergia entre ingredientes del comestible tales como los polisacáridos y el efecto de incremento de la supervivencia de los microorganismos cuando los mismos son cultivados en presencia de almidón resistente y/o cuando se incluye almidón resistente adicional con los microbios. Esto puede demostrarse por medio del crecimiento de las bacterias *Bifidobacterium* de la cepa C en presencia de glucosa (0,5%) o de Almidón 1 (0,25%) + glucosa (0,25%) o de Almidón 2 (0,5%) o de Almidón 2 (0,25%) + glucosa (0,25%). Las células de *bifidobacterium* fueron recolectadas tras 40 horas de cultivo anaeróbico, y las muestras fueron divididas en dos. Una parte fue usada directamente, y la otra parte fue mezclada con un 2,5% de Almidón 1 por espacio de 1 hora. Las células en solitario o las células más los gránulos de almidón fueron entonces recolectados mediante centrifugación y fueron puestos de nuevo en suspensión en leches fermentadas tipo yogur que fueron entonces almacenadas a temperatura ambiente y muestreadas a los 0, 1, 2, 5 y 6 días para proceder a la determinación de las células de *bifidobacterium* viables. Como puede verse en las Figuras 13 y 14, había una sinergia demostrable entre la presencia de polisacárido en el yogur B y el crecimiento en presencia de almidón resistente en comparación con la glucosa.

Ejemplo 11

Se estableció que las células bacterianas unidas a una superficie sobreviven a los estados de estrés mejor que las células no unidas. En este ejemplo se descubrió que las células de *bifidobacterium* cultivadas en Almidón resistente 1 se adherían dos veces mejor a los gránulos de Almidón 1 en comparación con lo que se observó en el caso de las células cultivadas con glucosa. Células de *Bifidobacterium* de la cepa C fueron cultivadas en PYG por espacio de 24 horas, y tras su recolección por centrifugación fueron puestas nuevamente en suspensión en una solución de Almidón 1 al 2,5% que estaba a un pH de 7,0 o a un pH de 2,5. Tras una hora de incubación fue evaluada la adherencia a los gránulos de almidón, y entonces el pH fue alterado para pasar de ser de 7,0 a ser de 2,5 y también para pasar de ser de 2,5 a ser de 7,0. Como puede verse en la Tabla 5, las células de la cepa C se adherían bien a un pH de 7,0 pero no a un pH de 2,5, y al ser el pH variado para pasar de ser de 7,0 a ser de 2,5, las células permanecían unidas, mientras que hubo un incremento de la adherencia cuando el pH fue incrementado para pasar de un pH de 2,5 a un pH de 7,0.

TABLA 5

Efecto del pH en la adherencia de Bifidobacterium de la cepa C al Almidón 1

Medición tras 1 h		Medición a las 2 h	
pH	Adherencia (%)	pH	Adherencia (%)
7.0	88.8	7.0	86.7
2.5	18.3	2.5	13.4
7.0	88.1	Cambio del pH a 2,5	75.5
2.5	19.51	Cambio del pH a 2,5	72.8

ES 2 273 664 T3

Usos

(I) Determinadas realizaciones específicas de la invención pueden ser aplicadas a situaciones para las cuales pueden usarse microbios probióticos, incluyendo el uso de los mismos como agentes profilácticos y terapéuticos, así como en composiciones alimentarias y de alimentación animal para beneficiar al huésped.

(II) Determinadas realizaciones específicas de la invención pueden ser aplicadas a situaciones para las cuales pueden usarse microbios probióticos para aplicaciones en tractos no digestivos tales como los tractos nasal y vaginal.

(III) Determinadas realizaciones específicas de la invención pueden ser aplicadas a situaciones relativas al biocontrol y la biorremediación.

(IV) Los microorganismos probióticos pueden ser cultivados en el medio basado en almidón y pueden ser usados directamente o bien en combinación con almidón adicional tras el cultivo. Estas suspensiones probióticas pueden ser usadas directamente o bien tras congelación y/o secado en ausencia o en presencia de aditivos adicionales.

(V) Los microorganismos probióticos que han sido descritos en el anterior punto (II) pueden ser añadidos a comestibles y piensos ya sea durante la producción o bien al final de la misma.

(VI) Además de a los comestibles y los piensos que se han descrito anteriormente en el punto (III), el almidón puede ser también añadido al comestible o pienso antes o después de la adición de los microorganismos probióticos.

(VII) Determinadas realizaciones específicas de la invención pueden ser también de aplicación a microorganismos, incluyendo cultivos de arranque, que se usen para la producción de comestibles fermentados, siendo estos microorganismos cultivados en medios basados en almidón y opcionalmente mezclados con almidón adicional tras el cultivo, la congelación y/o el secado, incrementando con ello la supervivencia de los microbios. Cuando estos microbios son añadidos como ingrediente, puede añadirse al comestible almidón adicional antes o después de la producción o bien durante la misma.

Realizaciones específicas de la invención se ocupan del hecho de que para muchos y distintos microorganismos entre los que se incluyen bacterias probióticas tales como bacterias del ácido láctico y bifidobacterias, la presencia de almidón resistente en el medio de cultivo puede en preparaciones sólidas y líquidas:

incrementar el crecimiento y/o la producción del microorganismo; e

incrementar el porcentaje de supervivencia o el porcentaje de recuperación de los microbios en comestibles, comestibles beneficiosos para la salud entre los que se incluyen comestibles nutracéuticos y/o funcionales, suplementos para la salud, comestibles y formulaciones comestibles destinados a los niños y a los ancianos, productos farmacéuticos, comestibles médicos tales como preparaciones alimenticias enterales, piensos para animales, piensos para animales de compañía, acuacultivo, piensos y suplementos para pájaros y suplementos alimentarios para el deporte y para incrementar el rendimiento.

A pesar de que los ejemplos que se han dado se refieren principalmente a productos alimentarios y probióticos, se entenderá que puede hacerse que tengan un incrementado potencial de crecimiento/producción o un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en uso otros microorganismos que son útiles para distintas aplicaciones como son por ejemplo las de biocontrol y biorremediación.

El crecimiento y la supervivencia pueden ser incrementados si se añade almidón resistente adicional a los microorganismos tras el cultivo, e incluso cuando dicho almidón resistente adicional es añadido a células cultivadas en ausencia de almidón resistente y que son posteriormente mezcladas con almidón.

Además, los microorganismos cultivados en presencia de almidón resistente son más resistentes a los estados de estrés *in vivo* tales como la aireación, el cizallamiento, la congelación, el secado, el secado por congelación, las altas temperaturas, las bajas temperaturas, las fluctuaciones de la temperatura, las fluctuaciones de la presión, las altas presiones, las bajas presiones, el bajo pH, el alto pH y la humedad.

El almidón resistente, incluyendo los tipos RS1, RS2, RS3 y RS4, puede consistir en almidones naturales que contengan almidón resistente y/o modificaciones de los mismos incluyendo las modificaciones tanto químicas como enzimáticas, y/o mezclas de los mismos. En los ejemplos se usaron ejemplos de dos almidones distintos, pero un experto en la materia entendería que también serían adecuadas para ser usadas en la presente invención otras formas de almidón resistente.

El acrecentado nivel de crecimiento/producción y/o supervivencia o recuperación que ha sido citado anteriormente es también de aplicación a la producción y al almacenamiento de las preparaciones de microorganismos.

Adicionalmente, fue sorprendente observar una sinergia con otros ingredientes de los comestibles entre los que se incluyen los disacáridos, los oligosacáridos y los polisacáridos cuando se supervisó el crecimiento/producción y/o la

ES 2 273 664 T3

supervivencia o recuperación de los microorganismos. Sería comprensible que puedan también actuar sinérgicamente otros ingredientes de los comestibles tales como las proteínas y las grasas.

5 También se observó que las células cultivadas en presencia de almidón resistente se adherían mejor a los gránulos de almidón, lo cual a su vez aseguraría una mejor supervivencia o recuperación. Puesto que el almidón resistente tiene una reducida digestibilidad, sería comprensible que otros compuestos indigestibles entre los que se incluyen proteínas y lípidos pudieran también dar lugar a un acrecentamiento del crecimiento/de la producción y/o de la supervivencia o recuperación de los microorganismos.

10 El estado de la técnica ha demostrado que la presencia de almidón resistente en las composiciones probióticas acrecienta la supervivencia de los microorganismos probióticos durante el consumo y después del mismo (AU 687253). Esta patente anterior de los presentes solicitantes presenta datos obtenidos al usar bifidobacterias con almidón adicional añadido. En contraste con ello, la presente invención es el resultado del inesperado descubrimiento de que las células
15 cultivadas en presencia de almidón resistente son más robustas sin la adición de más almidón. Sorprendentemente, cuando los microorganismos son cultivados en presencia de almidón resistente, pudiendo ser añadido a las células cultivadas en presencia de almidón adicional, se da un acrecentado crecimiento/una acrecentada producción y/o una acrecentada supervivencia o recuperación del microorganismo. Esto quiere decir que las células microbianas cultivadas en presencia de almidón resistente son más robustas. Además, la adición de almidón resistente a las células cultivadas en ausencia de almidón puede acrecentar la robustez de esas células.
20

Los expertos en la materia entenderán que las realizaciones específicas de la presente invención pueden ser objeto de numerosas variaciones y/o modificaciones. Las presentes realizaciones deben ser por consiguiente consideradas en todos los aspectos como realizaciones ilustrativas y no limitativas.
25

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para preparar una preparación microbiana que tiene un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en un producto, comprendiendo el procedimiento los pasos de producir o cultivar microbios en medios basados en almidón resistente o que lo contengan, y recolectar los microbios cultivados, teniendo los microbios recolectados un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación al ser posteriormente incorporados a un producto en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en un medio carente de almidón resistente.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el producto es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de un producto alimentario, de alimentación animal, nutracéutico, farmacéutico, de biocontrol y de biorremediación.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que el almidón resistente es del tipo RS1, RS2, RS3 o RS4.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que el almidón resistente se deriva de almidón seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de almidón de maíz, de arroz, de cebada, de trigo, de legumbres, de patatas y de plátanos.
- 20 5. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el almidón resistente se deriva de almidón que tiene un contenido de amilosa de al menos un 40% (en peso).
6. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el almidón resistente se deriva de almidón de maíz.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el almidón de maíz tiene un contenido de amilosa de al menos un 70% (en peso).
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el almidón de maíz tiene un contenido de amilosa de al menos un 80% (en peso).
9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el almidón de maíz tiene un contenido de amilosa de al menos un 90% (en peso).
- 35 10. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el almidón está tratado o modificado química, física y/o enzimáticamente.
- 40 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la modificación química es seleccionada de entre los miembros del grupo que consta de oxidación, reticulación, eterificación, esterificación, acidificación, dextrinización y mezclas de tales procesos.
12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el tratamiento físico es un tratamiento con calor y humedad para acrecentar o incrementar el contenido de almidón resistente del almidón.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el tratamiento consiste en una extracción con disolvente para retirar del almidón las grasas y/o los minerales.
14. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el almidón resistente es usado en el medio a una concentración de un 0,01 a un 10% (en peso).
- 50 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el almidón resistente es usado en el medio a una concentración de un 0,1 a un 5% (en peso).
- 55 16. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el almidón resistente es usado en el medio a una concentración de un 1% (en peso).
- 60 17. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que en uso los microbios son resistentes a la aireación, al cizallamiento, al secado por congelación, a la congelación, al secado incluyendo la alta, la mediana y la baja hidroactividad, a las elevadas temperaturas, a las bajas temperaturas, a la presión y a las fluctuaciones de presión, al bajo pH, al alto pH, a los ácidos biliares, a la humedad, a la alta osmolaridad, a la baja osmolaridad, a las condiciones altamente salinas o a combinaciones de dichas condiciones.
18. Procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la preparación microbiana es un probiótico, un cultivo de arranque o un producto de biocontrol o de biorremediación.
- 65 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que los microbios son microorganismos probióticos de los géneros seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de los géneros *Saccharomyces*, *Bifidobacterium*,

ES 2 273 664 T3

Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Propionibacterium, Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Staphylococcus, Peptostreptococcus y Lactobacillus.

5 20. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que los microbios son cultivos de arranque seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de bacterias del ácido láctico entre las que se incluyen los géneros *lactobacillus*, *lactococcus* y *streptococcus*, *leuconostoc* y levaduras.

10 21. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que los microbios son adecuados para ser usados en biocontrol o biorremediación, siendo dichos microbios seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de bifidobacterias, *acidophilus*, hongos, especies de *Bacillus*, *pseudomonadas* y Alcaligenes.

15 22. Preparación microbiana que contiene microbios que tienen un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en el producto en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en un medio carente de almidón resistente y que puede ser preparada por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

20 23. Producto que contiene microbios que tienen un incrementado porcentaje de supervivencia/recuperación en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en un medio carente de almidón resistente, incluyendo el producto una preparación microbiana según la reivindicación 22.

25 24. Producto según la reivindicación 23, seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de un producto alimentario, un producto de alimentación animal, un producto nutracéutico, un producto farmacéutico, un producto de biocontrol y un producto de biorremediación.

30 25. Producto según la reivindicación 24, que es un producto alimentario, un producto de alimentación animal, un producto nutracéutico o un producto farmacéutico seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de productos alimentarios basados en fluidos, fluidos basados en agua, productos alimentarios basados en cereales y plantas, productos alimentarios basados en sólidos, tabletas, aditivos alimentarios, suplementos para la salud y preparaciones farmacéuticas.

35 26. Producto según la reivindicación 25, en el que los productos alimentarios basados en fluidos incluyen productos lácteos en los que el ingrediente comestible es uno o varios ingredientes lácteos entre los que se incluyen la leche entera, los sólidos de la leche, la grasa de leche, la crema, la leche secada sin grasa y cualquier otro componente o derivado de la leche que sea adecuado para ser usado en productos lácteos.

40 27. Producto según la reivindicación 25, en el que los productos alimentarios basados en sólidos incluyen barras de tentempié, cereales para desayuno, pan, dulces, productos alimentarios extrusionados, barras de muesli, bollos, galletas, pellas de pienso y productos alimentarios recubiertos.

45 28. Producto según la reivindicación 24, que es un producto alimentario que es adecuado para contener y suministrar microorganismos probióticos.

50 29. Producto alimentario según la reivindicación 28, seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de comestibles, bebidas frutales, cubitos de agua, dulces, recubrimientos o coberturas, yogures, bebidas de yogur, bebidas no fermentadas, bebidas lácteas saborizadas, bebidas lácteas modificadas, helados y postres lácteos.

55 30. Uso de almidón resistente en medios de cultivo microbiano para producir microbios que al ser posteriormente usados en un producto tras haber sido recolectados a partir del medio tienen un incrementado porcentaje de supervivencia en comparación con los mismos microbios producidos o cultivados en medios carentes de almidón resistente.

60 31. Uso según la reivindicación 30, en el que el producto es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de un producto alimentario, un producto de alimentación animal, un producto nutracéutico, un producto farmacéutico, un producto de biocontrol y un producto de biorremediación.

65 32. Uso según la reivindicación 30 o 31, en el que el almidón resistente es del tipo RS1, RS2, RS3 o RS4.

33. Uso según la reivindicación 32, en el que el almidón resistente se saca de almidón seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de almidón de maíz, de arroz, de cebada, de trigo, de legumbres, de patatas y de plátanos.

60 34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 30-33, en el que el almidón resistente se saca de almidón que tiene un contenido de amilosa de al menos un 40% (en peso).

65 35. Uso según la reivindicación 34, en el que el almidón resistente se saca de almidón de maíz.

36. Uso según la reivindicación 35, en el que el almidón de maíz tiene un contenido de amilosa de al menos un 70% (en peso).

ES 2 273 664 T3

37. Uso según la reivindicación 35, en el que el almidón de maíz tiene un contenido de amilosa de al menos un 80% (en peso).

5 38. Uso según la reivindicación 35, en el que el almidón de maíz tiene un contenido de amilosa de al menos un 90% (en peso).

39. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 30-38, en el que el almidón está tratado o modificado química, física y/o enzimáticamente.

10 40. Uso según la reivindicación 39, en el que la modificación química es seleccionada de entre los miembros del grupo que consta de oxidación, reticulación, eterificación, esterificación, acidificación, dextrinización y mezclas de dichos procesos.

15 41. Uso según la reivindicación 39, en el que el tratamiento físico es un tratamiento con calor y humedad para acrecentar o incrementar el contenido de almidón resistente del almidón.

42. Uso según la reivindicación 39, en el que el tratamiento es por extracción con disolvente para retirar del almidón las grasas y/o los minerales.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

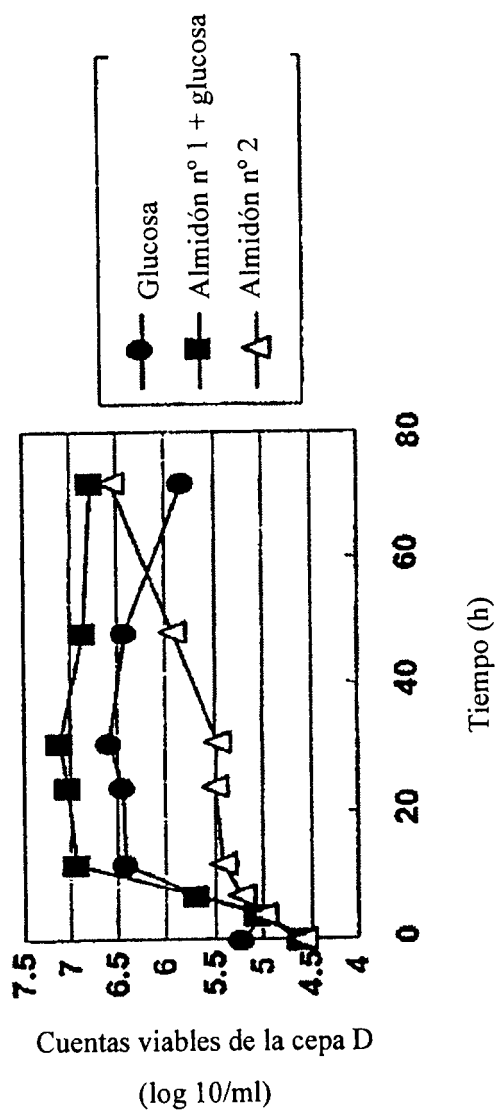


Figura 1

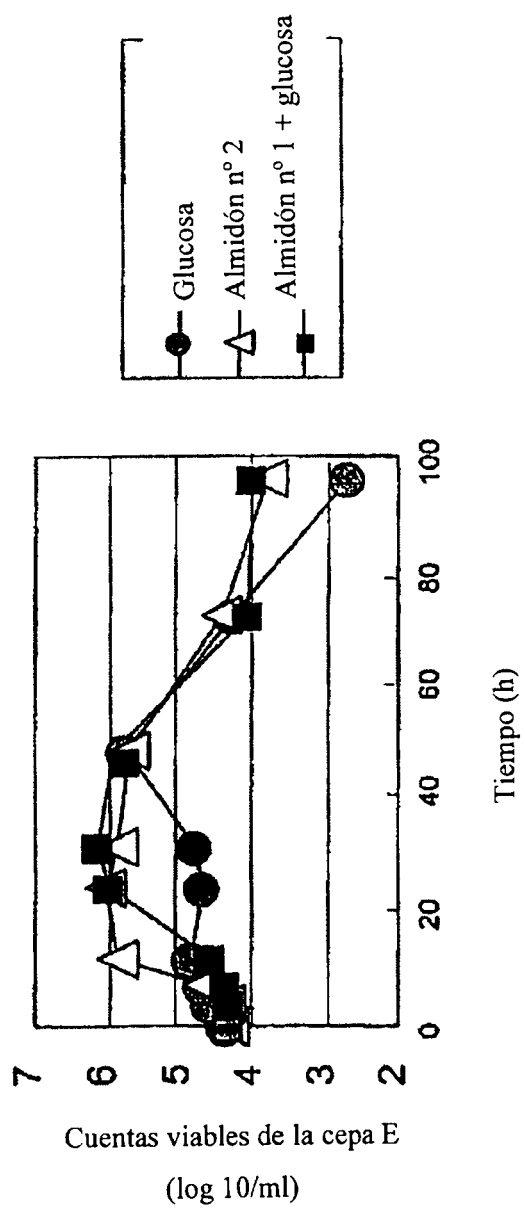


Figura 2

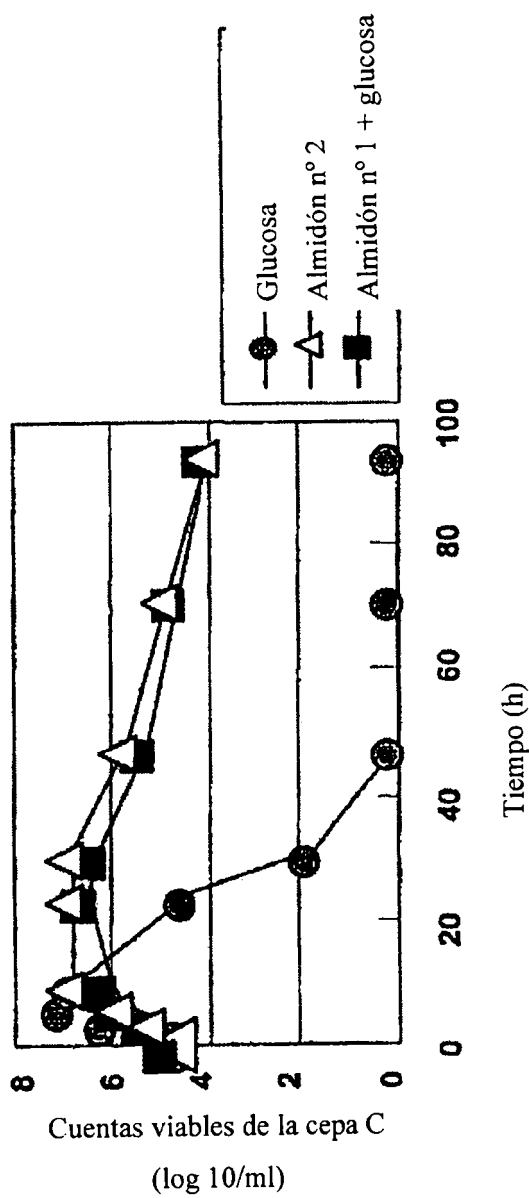


Figura 3

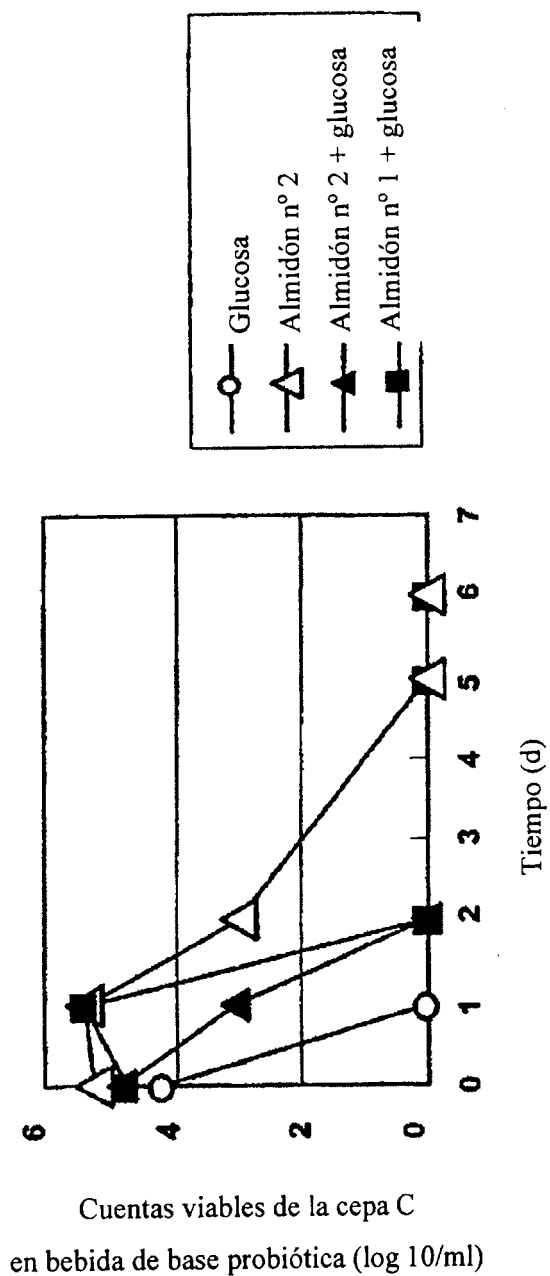


Figura 4

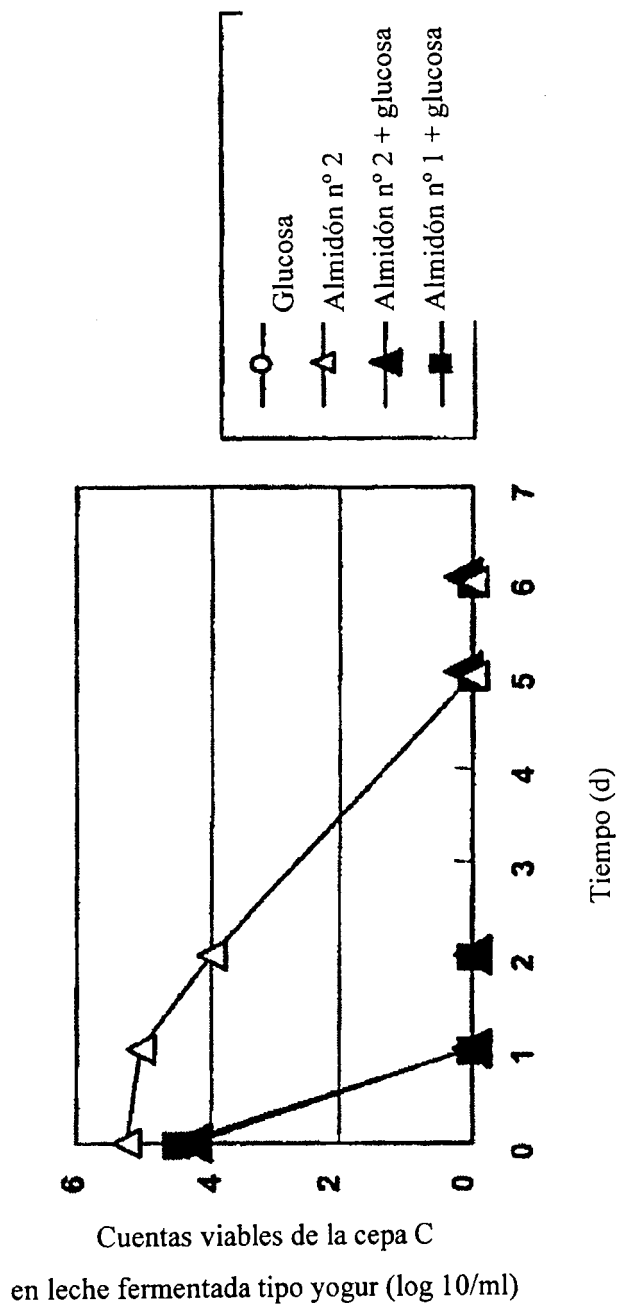


Figura 5

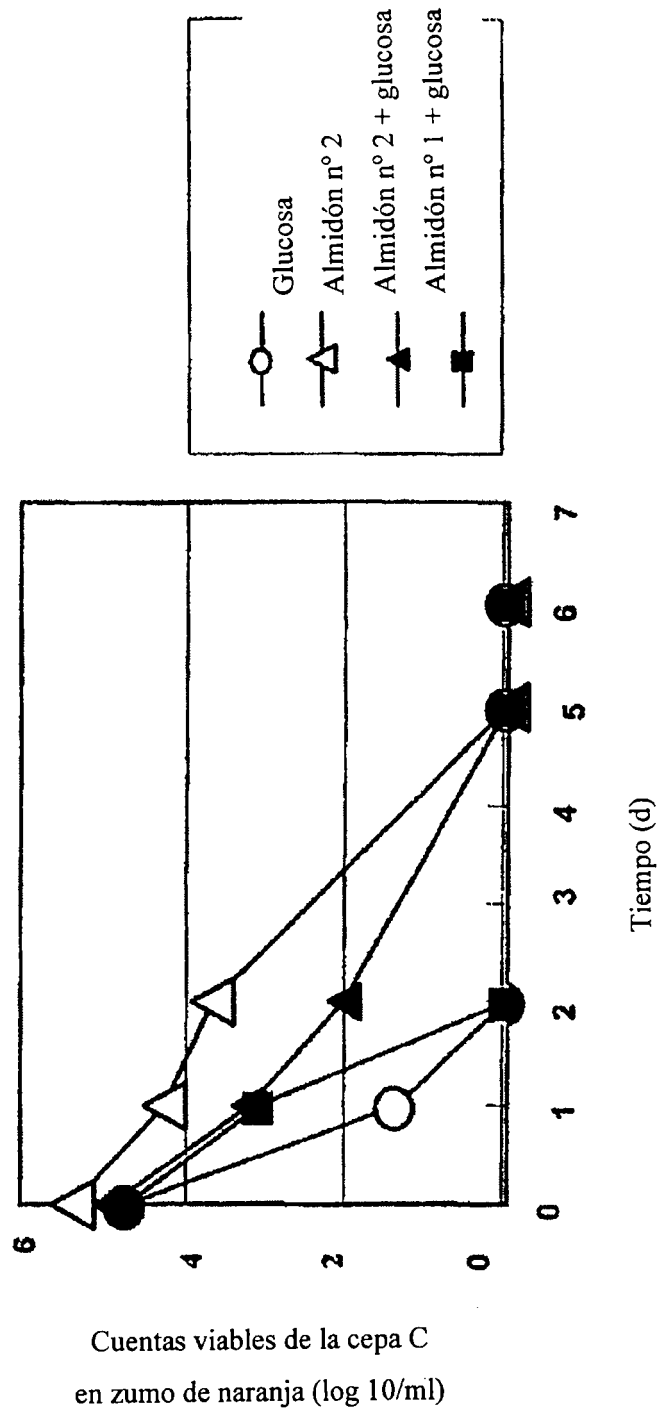


Figura 6

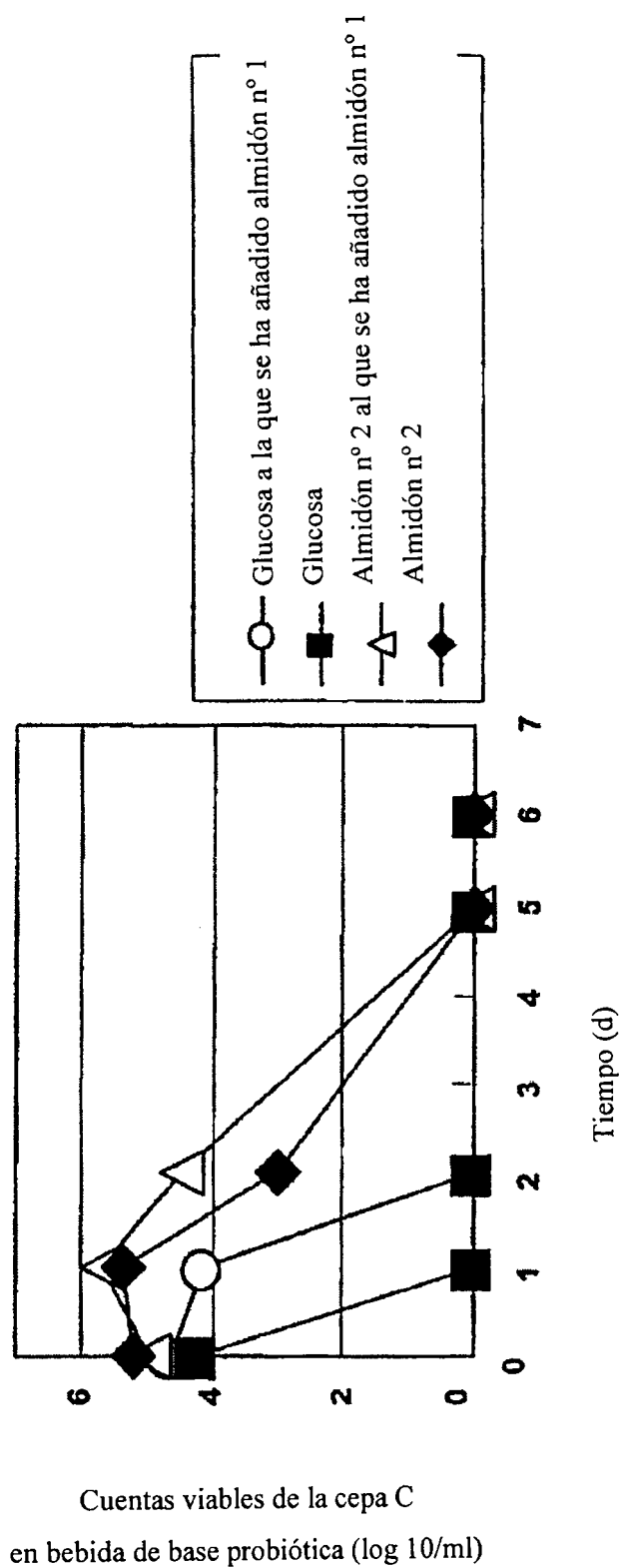


Figura 7

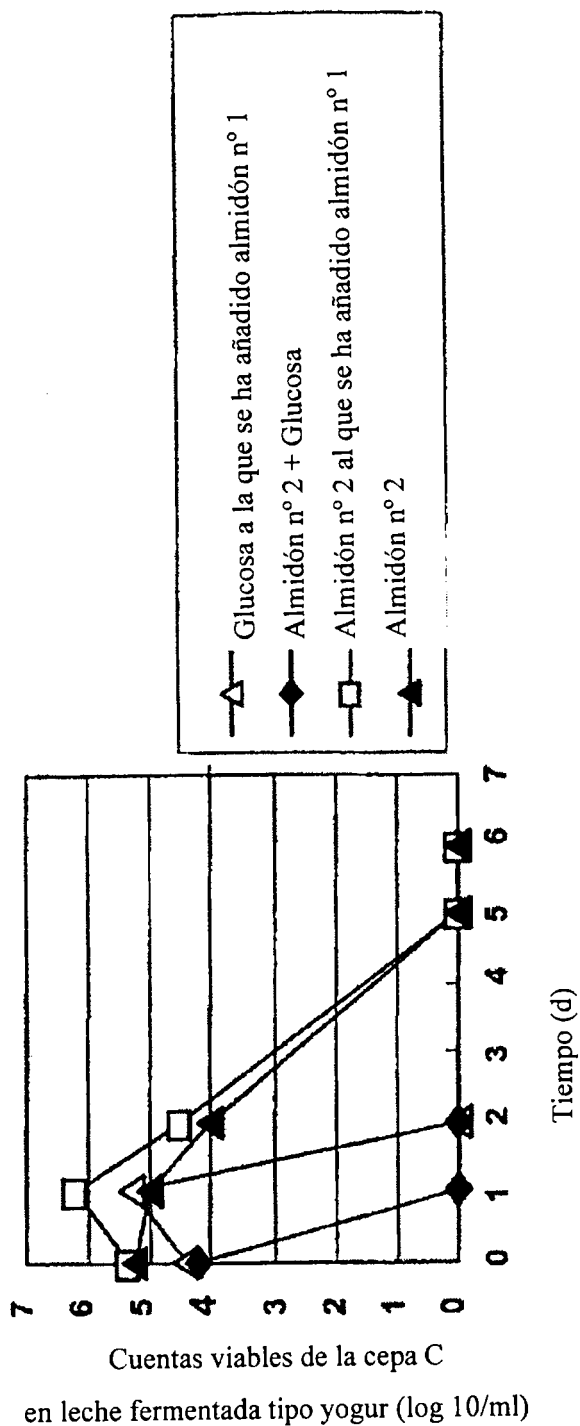


Figura 8

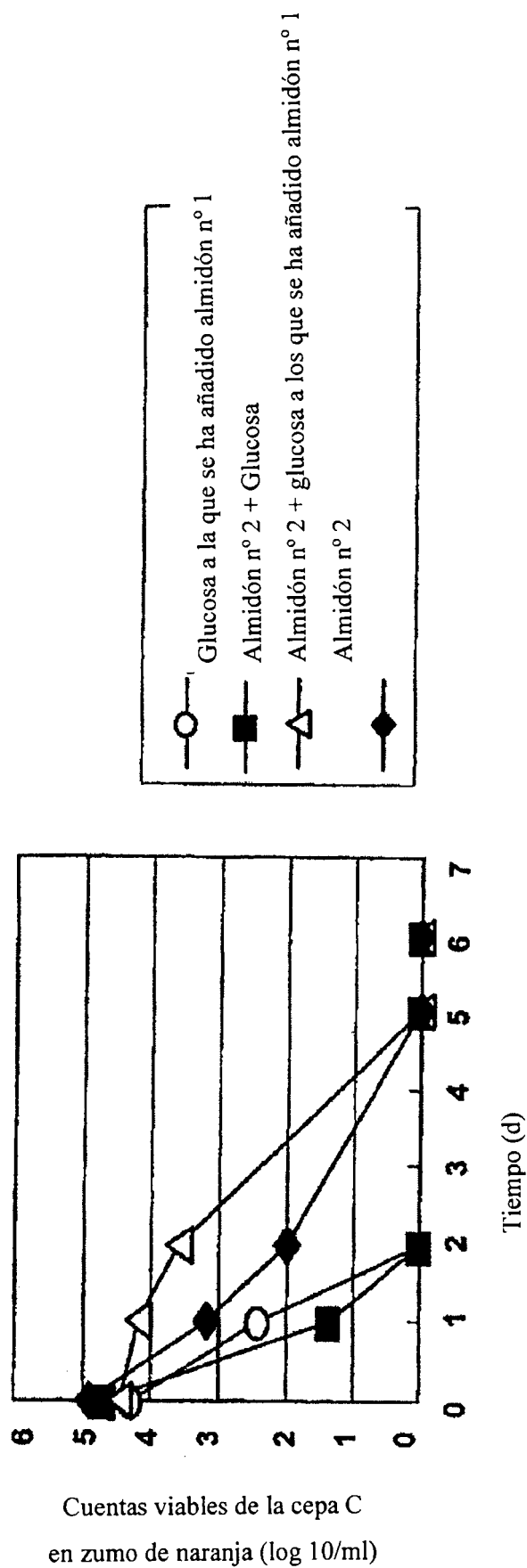


Figura 9

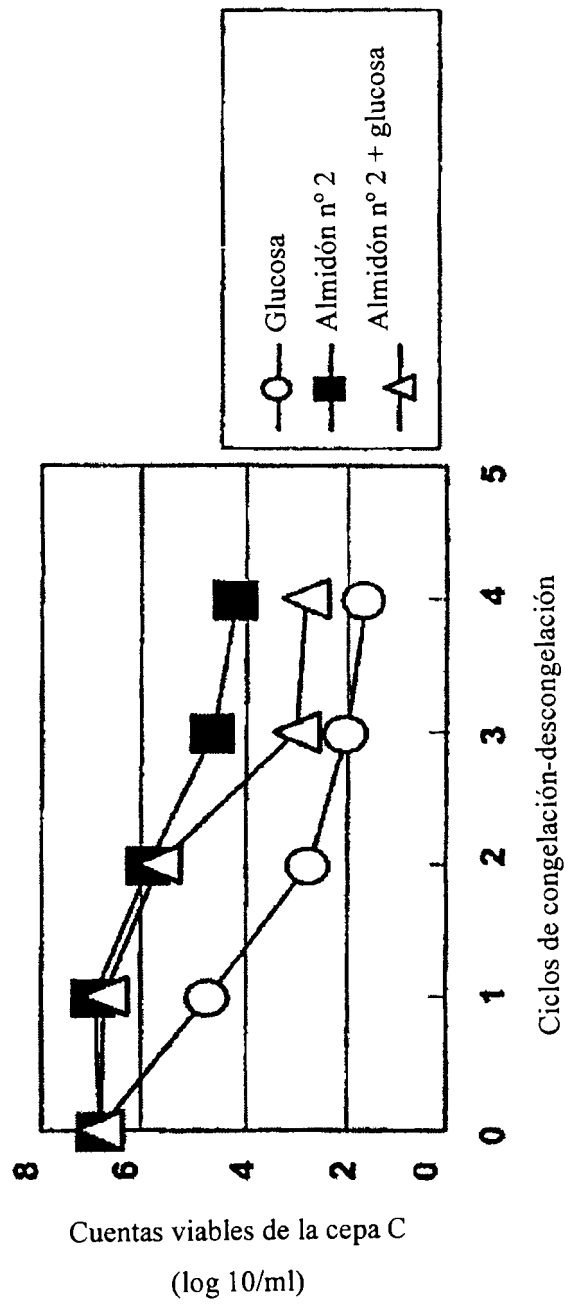


Figura 10

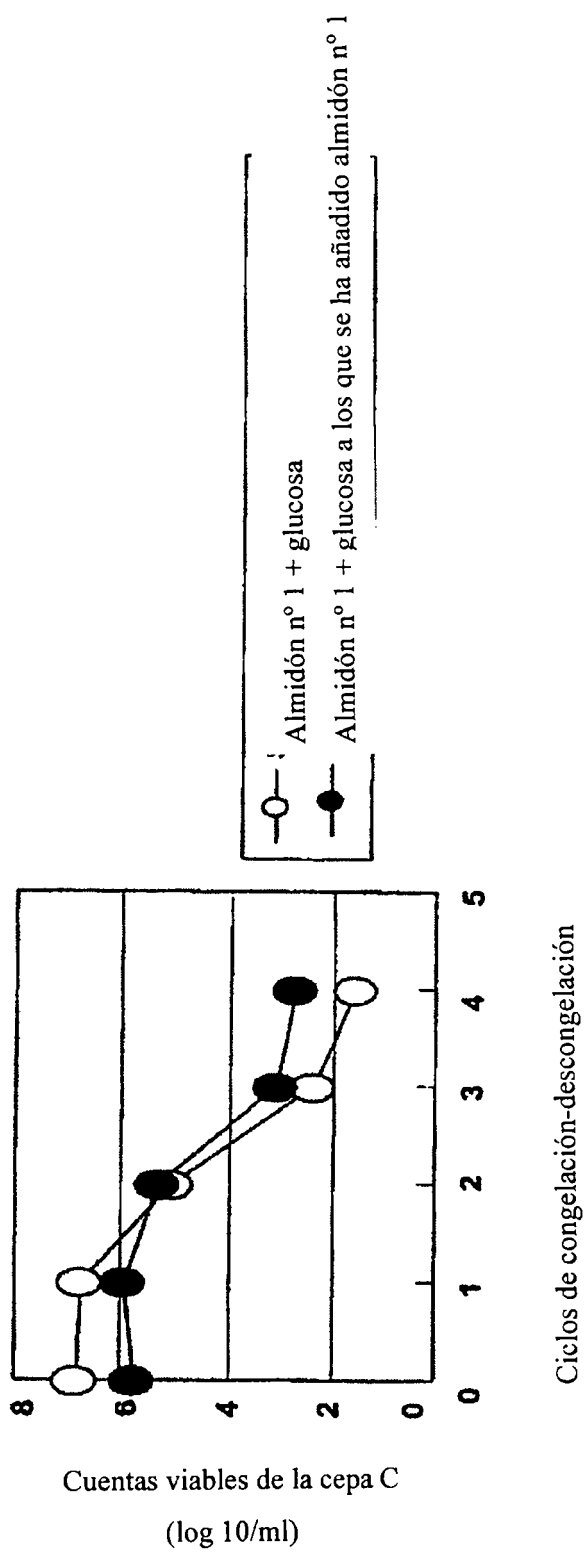


Figura 11

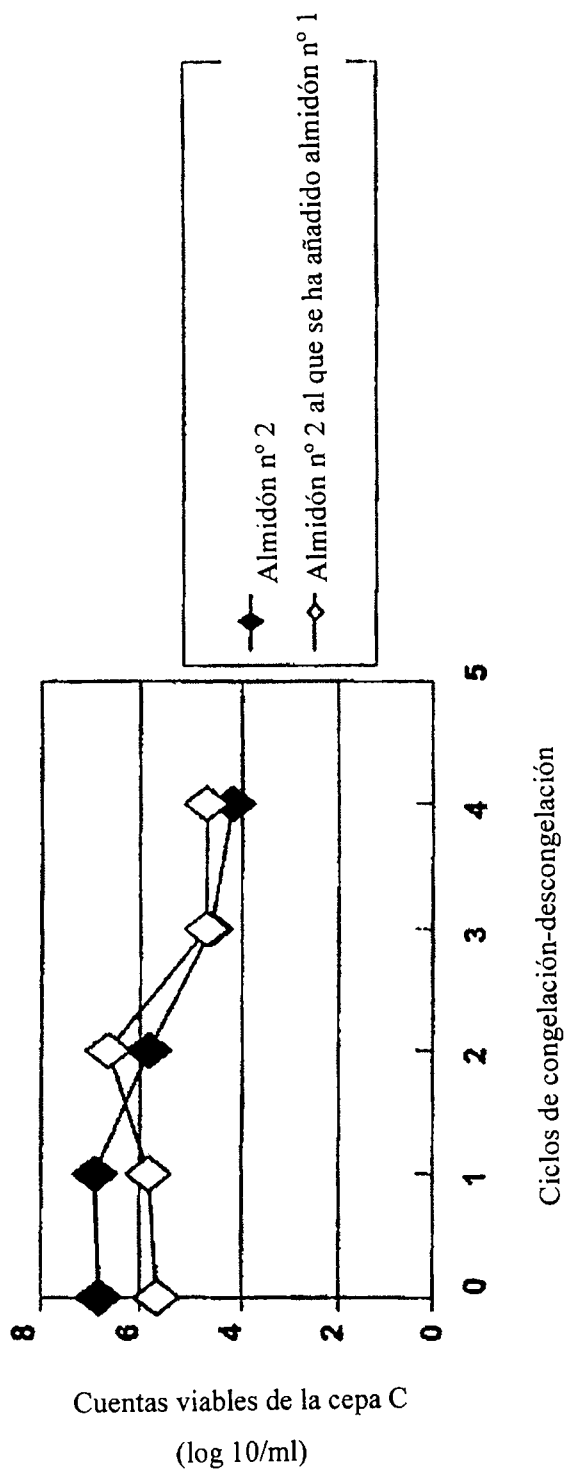


Figura 12

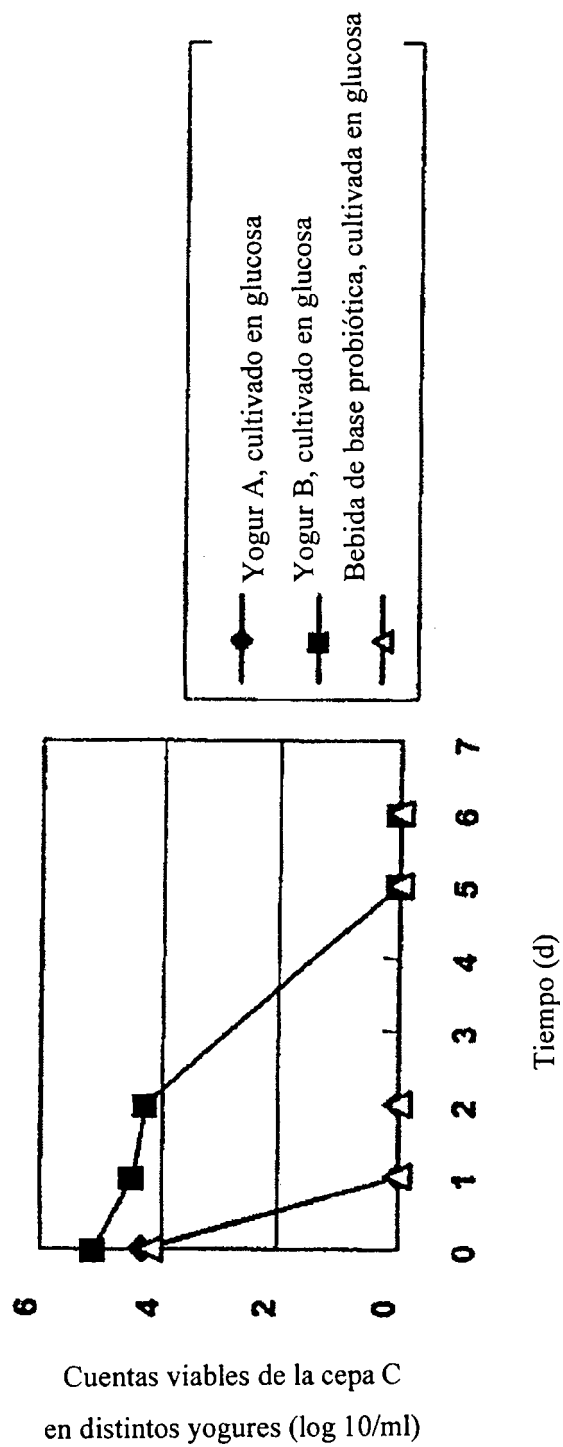


Figura 13

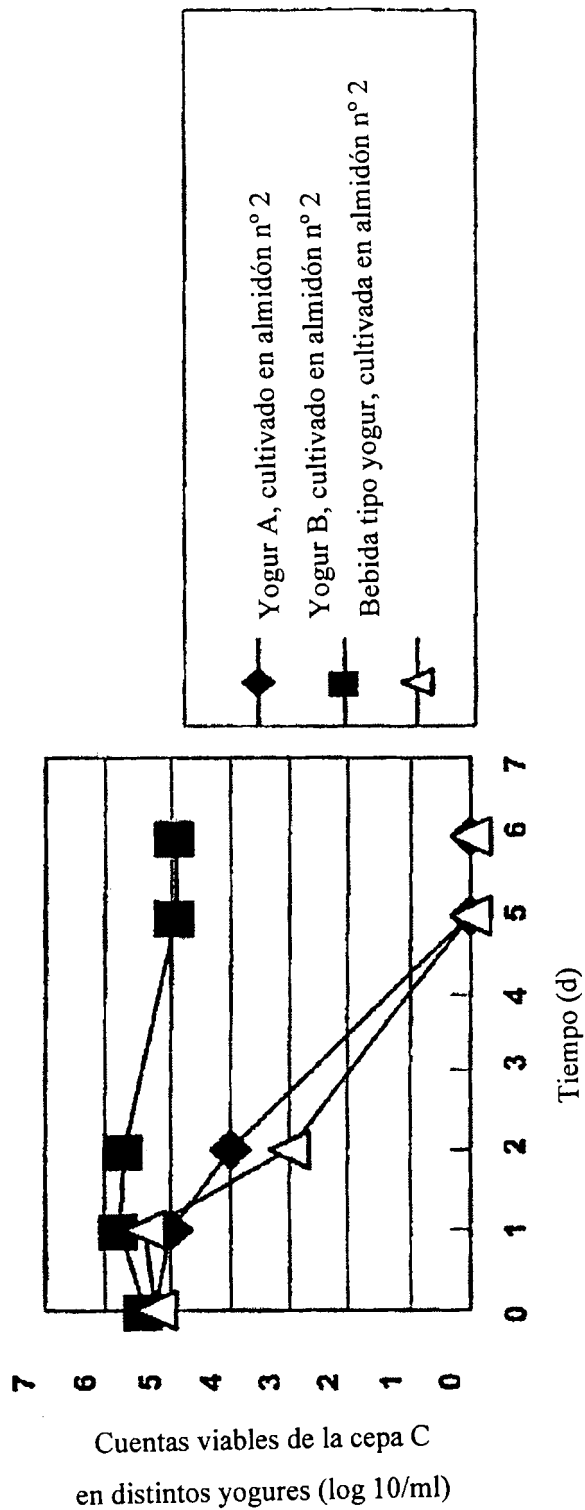


Figura 14